

Studies on cell division and telomerase activity in primary cultured cells of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*)

著者	郎 ??
内容記述	Thesis (Ph. D. in Agriculture)--University of Tsukuba, (A), no. 3363, 2004.3.25 Includes bibliographical references
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/2241/4046

氏 名（国籍）	らん 郎 がん ふあ 剛 華（中 国）
学 位 の 種 類	博 士（農 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 3363 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	Studies on Cell Division and Telomerase Activity in Primary Cultured Cells of Penaeid Shrimp (<i>Penaeus japonicus</i>) (クルマエビ (<i>Penaeus japonicus</i>) 培養細胞の細胞分裂およびテロメラーゼ活性に関する研究)
主 査	筑波大学教授 工学博士 松 村 正 利
副 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 工学博士 王 碧 昭
副 査	筑波大学教授 農学博士 前 川 孝 昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

エビ養殖は東南アジア諸国などでは重要な産業の一つである。近年、高密度養殖や飼料の過剰投与などによる飼育環境の悪化が顕在化し、それに伴って細菌性またはウイルス性疾病が多発するようになり、養殖業に大きなダメージを与えている。環境改善は長期計画にならざるを得ないため、緊急な対策として細菌性またはウイルス性感染症の予防策が求められている。しかし、このための基礎研究に必須となるエビの細胞樹立株は未だ世界中で取得されておらず、病原に対するエビの防疫機構の解明やワクチン開発にとって大きな足枷となっている。

本研究では、エビ細胞を分裂させる適切な培養条件を検討し、クルマエビの様々な組織培養を実施した。その結果、特にリンパ様器官の細胞が活発な移行能力を有すること、また初代培養中のリンパ様器官細胞と卵巣細胞における分裂細胞は、色々な形態をとることを見出した。ある分裂細胞は“非対称細胞分裂”を行うことも発見された。異なる二つの娘細胞を生じる“非対称細胞分裂”は、多細胞生物の発生にとって、細胞の多様性を作り出す基本的なプロセスであり、発生の様々な局面で重要な役割を果たしている。このため、本研究において培養したエビ初代細胞には低分化細胞が含まれていたことが示唆された。また中期染色体は初代リンパ様器官の細胞によって創られるが、エビの中期染色体は数が多くて、サイズが小さいことが示された。細胞分裂は細胞株化の樹立に重要であり、これらの結果はこの研究分野の新しい進展と考えられる。

エビ細胞は付着性細胞であるため、継代には付着細胞の剥離が不可欠である。本研究ではトリプシン、Ⅰ型コラゲナーゼとⅡ型コラゲナーゼを用いて、それぞれの継代効果を検討した。その結果、0.25%トリプシンと0.2%Ⅱ型コラゲナーゼ処理において良好な継代を達成することは確認された。またヒアルロニダーゼを付加することで、継代効果が向上することも明らかにした。

一方、テロメアは染色体の末端部に存在する単純な繰り返しの塩基配列である。テロメアは細胞寿命の“時計”と認められている。テロメアの長さが非常になると細胞老化が開始する。テロメラーゼはRNA 鋳型及び逆転写酵素よりなる酵素で、各染色体末端の分裂ごとに失われるはずの塩基配列を補充する能力を有している。ほとんどのヒト正常体細胞はテロメラーゼ活性を失うが、生殖細胞、ある種の幹細胞、多くの悪

性ガン細胞ではテロメラーゼ活性が保持されている。さらにテロメラーゼ遺伝子を導入することで初代培養細胞が不死化されることは認められている。そこで本実験では、TRAP 法を用いてエビ組織におけるテロメラーゼの有無について検討した。TRAP 反応系の中にインターナル増幅コントロールを導入し、テロメラーゼ活性を比べることができた。エビ生殖器官の組織は、ほかの器官の組織より高いテロメラーゼ活性を持っていることが確認され、さらに初代培養エビリンバ様器官細胞と卵巢細胞にもテロメラーゼ活性が保持されていることを明らかにした。RNアーゼ、プロテイナーゼKや熱処理はこのテロメラーゼを不活化させること、さらに TRAP 産物をクローニングしてシーケンスした結果、テロメラーゼがTSプライマーにTTAGG配列を繰り返し付加することを確認した。これより、エビテロメアの繰り返しの塩基単位はTTAGGであることが示唆された。

Real-timePCRを用いてテロメアの長さを測定する方法を検討した。本実験で確認されたテロメアのシーケンスに基づいて特異的プライマーをデザインし、このプライマーを用いて初代培養エビリンバ様器官細胞テロメア長さの測定を行った。その結果、未培養のリンバ様器官組織は培養された細胞より長いテロメアを持ち、培養時間の経過に伴ってテロメアが短くなることが確認された。このことからテロメラーゼ活性が低いため、培養細胞のテロメアが短くなり、細胞は長期の培養が困難となることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はエビ細胞を分裂させる適当な培養条件、及び培養エビ細胞の寿命と関連する因子を検討したものである。

本研究では、エビ初代細胞を分裂させることに成功し、エビ細胞分裂過程や“非対称細胞分裂”等を発見すると共に、中期染色体が初代リンバ様器官の細胞からも作製されることを見出した。TRAP 法によって、エビテロメラーゼの特性が検討され、エビ組織にテロメラーゼが存在することが確認された。TRAP 反応系の中にインターナル増幅コントロールを導入して、テロメラーゼ活性を比べることができた。TRAP 産物をクローニングしてシーケンスし、エビのテロメラーゼがTSプライマーにTTAGG配列を繰り返し付加することが明らかされた。エビ生殖器官の組織は、ほかの器官の組織より高いテロメラーゼ活性を持っていることを確認すると共に、初代培養エビリンバ様器官細胞と卵巢細胞にテロメラーゼ活性が保持されていることも明らかにした。また、Real-timePCRを用いてテロメアの長さを測定する方法を確立した。未培養のリンバ様器官組織は培養された細胞より長いテロメアを持ち、培養時間の経過に伴い、細胞のテロメアが短くなることが確認された。テロメラーゼ活性が低いため培養細胞のテロメアは短くなり、細胞は長期の培養が困難となることが示唆された。本研究結果は、今後エビ細胞株の樹立に重要な指針を与えるものと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。